



TITLE:

Genome-wide microhomologies enable precise template-free editing of biologically relevant deletion mutations(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Janin, Grajcarek

CITATION:

Janin, Grajcarek. Genome-wide microhomologies enable precise template-free editing of biologically relevant deletion mutations. 京都大学, 2020, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22379>

RIGHT:

NATURE COMMUNICATIONS | (2019) 10:4856 |
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12829-8> |

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏名	Janin Grajcarek
論文題目	<i>Genome-wide microhomologies enable precise template-free editing of biologically relevant deletion mutations</i> (ゲノムワイドなマイクロホモロジーを活用した正確かつテンプレートフリーなヒト欠失変異のゲノム編集技術の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>The functional effect of a gene edit by designer nucleases depends on the DNA repair outcome at the targeted locus. While non-homologous end joining (NHEJ) repair results in various mutations, microhomology-mediated end joining (MMEJ) creates precise deletions based on the alignment of flanking microhomologies (μHs). Recently, the sequence context surrounding nuclease-induced double strand breaks (DSBs) has been shown to predict repair outcomes, for which μHs play an important role. MMEJ, which was originally thought to be only a backup pathway, has been found to be active in human cells competent for NHEJ and homology-directed repair.</p> <p>Here, a bioinformatics program called MHcut was designed to survey the extent to which all naturally occurring human deletion variants are flanked by μHs. It identified that 11 million or 57% are flanked by μHs, covering 88% of protein-coding genes. These biologically relevant mutations are candidates for precise creation in a template-free manner by programmable nuclease-induced DSBs and MMEJ repair. Using CRISPR/Cas9 in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), pathogenic deletion mutations in the genes DYSF, ALAS2 and FECH were efficiently created with MMEJ ratios of more than 75% for demonstrable disease models exhibiting both gain- and loss-of-function phenotypes.</p> <p>The MHcut dataset and the gene editing strategy will enable not only functional genetic studies and drug screening, but can also potentially be applied to gene therapy.</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>マイクロホモロジー媒介末端結合 DNA 修復 (MMEJ) は、DNA 損傷部位に存在するマイクロホモロジー (μH) と呼ばれる短い相同配列を認識して起こる修復反応であり、その過程で一つの μH 及び μH に挟まれた領域が欠損することが知られている。本研究ではまず、ヒトゲノムの欠失変異に隣接する μH を同定する MHcut というツールを開発した。その結果、ヒトゲノムで生じる欠失変異の 57% (1,100 万個) が μH に隣接しており、タンパク質をコードする遺伝子の 88%を占めることが明らかになった。続いて、MMEJ 機構がゲノム上に正確な欠失を高効率で発生させる性質を活用し、iPS 細胞を用いて疾患モデルを作製する方法の開発を目指した。具体的には、筋ジストロフィーの原因遺伝子 DYSF、およびプロトポルフィリン症の原因遺伝子 ALAS2 と FECH に、CRISPR/Cas9 を用いて MMEJ を誘導し、疾患と同一の変異を高頻度で再現することに成功した。また、作製した変異 iPS 細胞をそれぞれ筋細胞、赤血球に分化させると、患者の細胞と同じ表現型が確認されたことから、MMEJ 機構を利用したゲノム編集により遺伝子疾患の病態を再現できることが示された。</p> <p>以上の研究はヒトゲノム全体の欠失突然変異に隣接する μH の存在に着目し、患者の持つ正確な遺伝子変異の表現型を解析可能な疾患モデル細胞を高効率に作製する技術の開発に寄与するところが大きい。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医科学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 02 年 02 月 04 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
